

## 第27回農学部賞 受賞者

- ・永田 葵  
生物資源生産科学コース 農学分野
- ・清川 倫名  
生物資源生産科学コース 生物生産環境工学分野
- ・田中 遼弥  
生物資源生産科学コース 農政経済学分野
- ・高橋 拓之  
応用生物科学コース 応用生命化学分野
- ・山岸 詩歩  
応用生物科学コース 食糧化学工学分野

# 第27回生物資源環境科学府賞 受賞者

- ・鶴見 祐土 (修士課程)  
資源生物学専攻 昆虫ゲノム科学  
「Production and Characterization of Recombinant  
Norovirus Virus-Like Particles Using the Silkworm-  
Baculovirus Expression System」
- ・張替 創太 (修士課程)  
環境農学専攻 気象環境学  
「特徴量エンジニアリングを組み込んだ ANN モデルによ  
る高 CO<sub>2</sub> 濃度下における作物群落蒸発散の推定」
- ・岩崎 瑛大 (修士課程)  
環境農学専攻 生物資源化学  
「Analysis of human dental pulp stem cell behavior on  
nanocellulose scaffolds with distinct surface functional  
groups」
- ・漆原 良太 (修士課程)  
生命機能科学専攻 生物物理化学  
「Rab タンパク質及び植物 RNA 編集タンパク質の分子機  
構解明を目指した立体構造解析」

- ・市場 優香 (修士課程)  
生命機能科学専攻 食品分析学  
「老化促進モデルマウスを用いたジペプチド Tyr-Pro の学習記憶改善作用に関する研究」
- ・野崎 翼 (博士後期課程)  
資源生物科学専攻 昆虫学  
「Systematics and Evolution of the Myrmecophilous *Homoeusa* Genus Complex (Coleoptera: Staphylinidae: Aleocharinae) (好蟻性ヒラタアリヤドリ属群 (甲虫目: ハネカクシ科: ヒゲブトハネカクシ亜科) の分類と進化)」
- ・永江 葉奈 (博士後期課程)  
資源生物科学専攻 アクアフィールド科学  
「九州北部におけるスジシマドジョウ類の分布・生態・遺伝的特性に関する研究」
- ・佐藤 忠道 (博士後期課程)  
環境農学専攻 森林保全学  
「Effects of forest cover changes on the initiation threshold and magnitude of rainfall-induced landslides (森林被覆の変化が豪雨を誘因とする斜面崩壊の発生と規模に及ぼす影響)」

- ・矢崎 雅菜 (博士後期課程)  
生命機能科学専攻 農業薬剤化学  
「ロジウム触媒を用いる無保護ペプチドジスルフィドへのパーフルオロアリアル基・アルシニル基挿入反応と超イオウ・複素環セレン誘導体の合成および機能」
  
- ・中村 紗彩 (博士後期課程)  
生命機能科学専攻 食品分析学  
「大豆由来ペプチドの生理機能評価のための *in silico* 法の展開に関する研究」

**Production and Characterization of Recombinant  
Norovirus Virus-Like Particles Using the  
Silkworm–Baculovirus Expression System**

Yuto Tsurumi

Laboratory of Insect Genome Science,  
Kyushu University Graduate School of  
Bioresource and Bioenvironmental Sciences

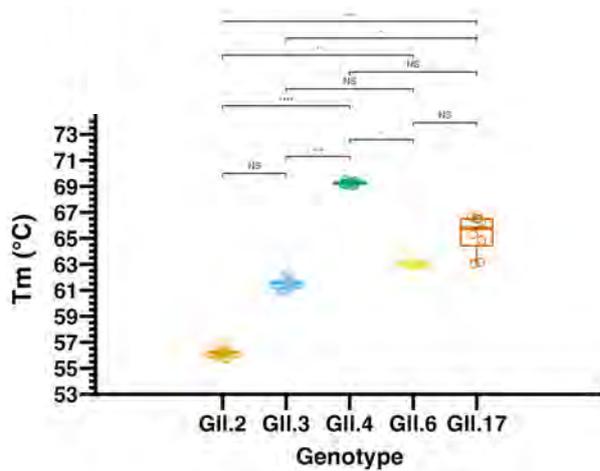
**Supervisor**

Affiliation: Faculty of Agriculture

Name: Takahiro Kusakabe

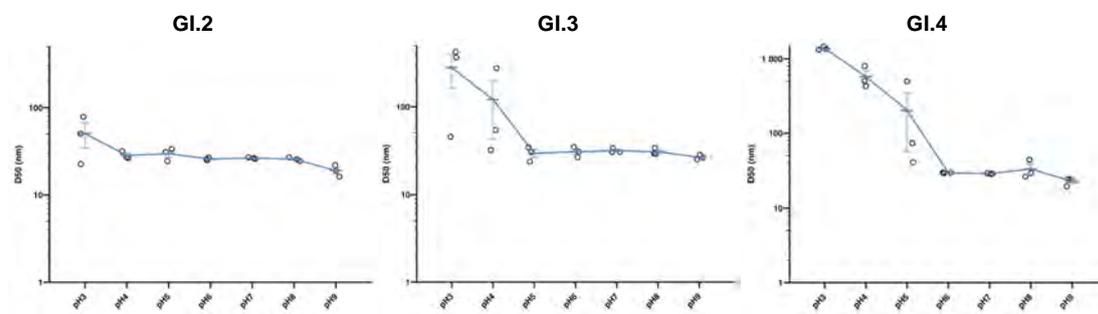
## **Abstract**

Norovirus (NoV) is a leading cause of acute gastroenteritis worldwide, yet no approved antiviral treatment or vaccines are currently available. Virus-like particles (VLPs), which mimic the viral capsid, represent a promising platform for vaccine development and virological studies. Noroviruses exhibit substantial genetic diversity, with GI and GII being the genogroups that predominantly circulate in humans. Although VLPs derived from the GII genogroup have been relatively well characterized, knowledge regarding the biochemical and structural properties of GI VLPs remains limited. In particular, efficient production methods, genotype-dependent differences in particle stability, and detailed structural characteristics remain poorly understood, hindering the rational design of broadly protective vaccines. Here, we systematically analyzed VLPs derived from nine NoV genotypes prevalent in Japan. For the GII genogroup, we examined genotype-dependent thermal stability and identified the P domain as a primary determinant underlying difference in particle stability among genotypes. For the GI genogroup, which is known to exhibit low production yields and particle heterogeneity, we optimized purification strategies using the silkworm–baculovirus expression vector system (Silkworm-BEVS). This optimization led to improved VLP recovery for all genotypes except GI.6. Comparative analyses of thermal and pH stability across genotypes revealed distinct stability profiles. Furthermore, structural analyses of three previously unresolved genotypes (GI.2, GI.6, and GII.6) provided insights into genotype-specific architectural features. In particular, analysis of GI.6, the most challenging genotype to produce, provided insights into molecular features that may underlie its low production efficiency. Overall, this work advances our understanding of genotype-dependent VLP formation, stability, and structural features, particularly within the understudied GI genogroup. These findings contribute to the rational design of next-generation NoV vaccines and provide new insights into NoV biology.



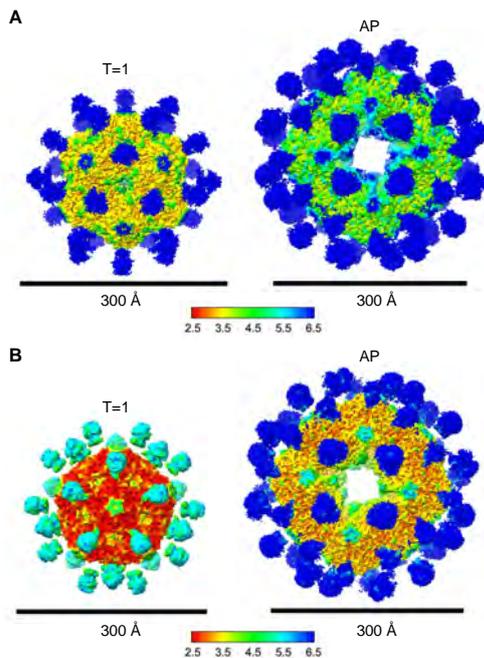
**Figure 1. Differential scanning fluorimetry (DSF) profiles of GII genotypes.**

Thermal denaturation profiles measured by differential scanning fluorimetry (DSF). Each measurement was performed in triplicate, and the entire experiment was repeated three times ( $n = 9$ ). Error bars represent standard deviation. Statistical significance is indicated as follows:  $p < 0.05$  (\*),  $0.0001 < p < 0.0005$  (\*\*),  $p < 0.0001$  (\*\*\*)



**Figure 2. Changes in particle size at different pH.**

D50 values measured by dynamic light scattering (DLS) are plotted for each pH. Error bars represent mean  $\pm$  standard error (SE).



**Figure 3. Cryo-EM structures of GII.6 VLPs.**

(A) Reconstruction of GII.6 VLPs imaged in the absence of stabilizing additives. (B) Reconstruction of GII.6 VLPs imaged in the presence of 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . In each panel, the left image shows particles exhibiting  $T = 1$  icosahedral symmetry, whereas the right image shows asymmetric particles (APs). Scale bars represent 300 Å. Maps are color-coded according to local resolution.

## 1. 緒言

作物群落の蒸発散速度 (ET) を正確に推定することは、農業用水の適切な管理において重要である。ET は気候変動の主要因である大気中 CO<sub>2</sub> 濃度上昇の影響を受ける (Kimball et al., 1999)。そのような環境下での ET 推定モデルにおける主要な課題は、CO<sub>2</sub> 上昇に伴う気孔開度の減少と葉面積の増加のような、ET の増減における相殺的な影響の表現にある (Lemaitre-Basset et al., 2022)。既往の研究では、CO<sub>2</sub> 上昇に伴う影響を十分に表現できないことによる ET 推定性能の低下が示唆されている (Zhou et al., 2022)。これに対し、その影響を詳細に表現するためにプロセスモデルを用いる研究もあるが、モデルパラメータ取得のために精緻な計測実験が必要となる。したがって、モデルパラメータを同定する過程を介さず、CO<sub>2</sub> 上昇に伴う作物応答を柔軟に表現できるモデリング手法の開発が求められる。

近年の ET 推定の研究における有望な手法として、人工ニューラルネットワーク (ANN) モデルが注目されている。本手法は、モデルパラメータの同定を介さず、入出力情報間の関係を学習することで、学習データの範囲内における情報を高精度に推定する。しかし、学習データ外の環境、特に十分な実測データを得ることが困難な高 CO<sub>2</sub> 濃度環境において、推定性能が低下する可能性がある。この課題に対し、入力変数をモデルの学習に適した変数へと変換する特微量エンジニアリング (FE) を ANN モデルと組み合わせることにより、推定性能が改善することが報告されている (Yokoyama et al., 2025)。一方で、高 CO<sub>2</sub> 特有の課題に対して本手法の有効性に対する検証は十分にされていない。そこで本研究では、FE を導入した ANN モデルを対象に、高 CO<sub>2</sub> 環境下での ET 推定性能を異なる学習データセットの元で比較評価した。

## 2. 計測サイトおよび ET 推定

本研究では、開放系大気 CO<sub>2</sub> 増加 (FACE) 実験施設である SoyFACE (Ainsworth et al., 2004) で測定された、トウモロコシ (*Zea mays* L.) 圃場のデータセットを使用した。データセットは、Ambient 区 (現在 CO<sub>2</sub> 濃度) と Elevated 区 (高 CO<sub>2</sub> 濃度) の双方から取得し、2006 年と 2024 年の測定データで構成されている。ET はエネルギー収支式に基づき、潜熱フラックスを算出することで推定した。主要な ET 取得手法として渦相関法があるものの、一般的な FACE 施設で対応できる範囲よりも広い均一な平地を要するため、本研究ではエネルギー収支の残差から潜熱フラックスを求める方法を用いた (Hussain et al., 2013)。

## 3. ANN モデルの概要

図 1 に ANN モデルの概略図を示す。FE を導入した ANN モデルである ANN<sub>FE</sub> は、作物個葉の蒸散速度 ( $Tr_L$ ) と葉面積指数 (LAI) を説明変数として、ET を目的変数とした。 $Tr_L$  は、個葉蒸散プロセスモデル群に環境情報 (光合成光量子束密度、気温、空気飽差、CO<sub>2</sub> 濃

度，風速，土壤の水ポテンシャル) を入力することで推定した．一方で，比較対象として構築した汎用的なデータ駆動型モデル  $ANN_P$  は，上述の環境情報と LAI を説明変数として，ET を目的変数とした．両モデルそれぞれにおいて，FE の導入による ANN モデルの推定性能への影響と，Elevated 区の学習データ追加による影響を調べるため，Ambient 区のデータのみ，Ambient 区学習データに Elevated 区のデータを追加して学習させる場合の 2 通りのアプローチで Elevated 区の ET を推定し，性能を比較評価した．

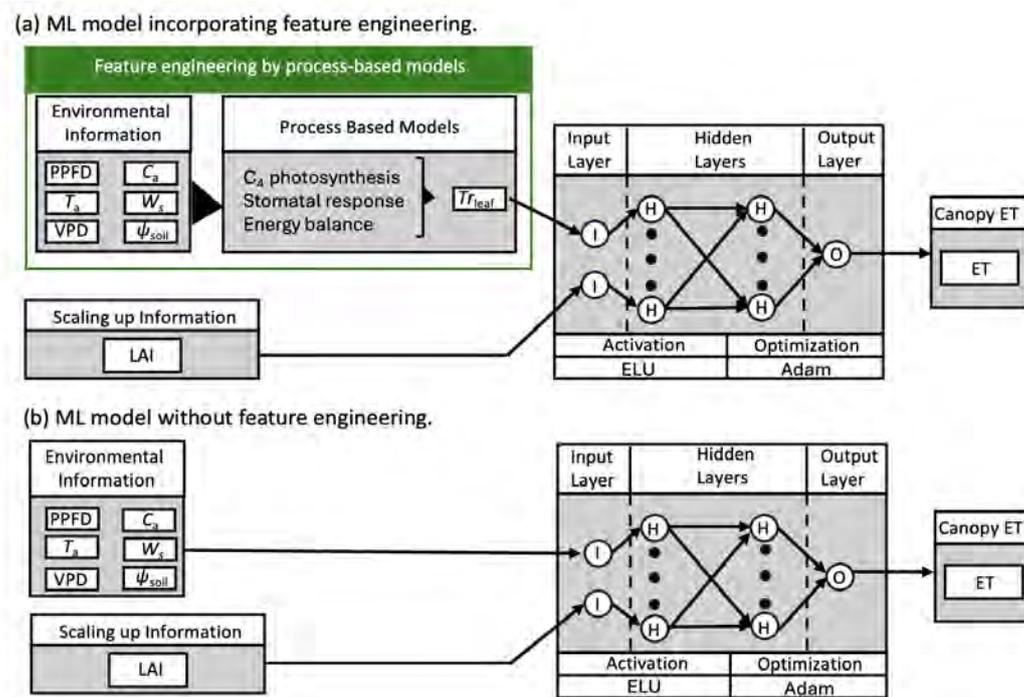


図 1 FE を導入した ANN ( $ANN_{FE}$ ) (a) と，導入していない ANN ( $ANN_P$ ) (b) の概略図．ただし，LAI:葉面積指数， $Tr_L$ :個葉の蒸散速度，ET:作物群落の蒸発散速度．

#### 4. 推定性能の評価指標

推定性能の評価指標として，誤差の大きさを示す二乗平均平方根誤差 (RMSE) (式 1)，推定値の過大・過小傾向を示すパーセント・バイアス (PBIAS) (式 2) を用いた．

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{o,i} - y_{p,i})^2}{n}}, \quad (1)$$

$$PBIAS = 100 \frac{\sum_{i=1}^n (y_{p,i} - y_{o,i})}{\sum_{i=1}^n y_{o,i}}, \quad (2)$$

この時， $n$  は観測データ数， $y_{o,i}$  と  $y_{p,i}$  は  $i$  番目の実測値と推定値である．PBIAS が正であれば過大推定の傾向にあり，負であれば過小推定の傾向を表す．

#### 5. 結果および考察

図 2 に， $ANN_{FE}$  と  $ANN_P$  の推定値と観測値の関係を表した散布図を示す．学習データに Ambient 区データのみを入力した (a)，(b) において， $ANN_{FE}$  は高い推定性能を示した (RMSE

平均：1.46 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, PBIAS 平均：-10.40%）。また、ANN<sub>P</sub>は過大推定の傾向を示した（RMSE 平均：1.65 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, PBIAS 平均：29.84%）。次に、学習データに Elevated 区データを追加した (c), (d) においても、ANN<sub>FE</sub>は高い推定性能を示した（RMSE 平均：1.06 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, PBIAS 平均：14.33%）。ANN<sub>P</sub>に関して、学習データに Elevated 区情報が含まれることで、(a), (b) で見られた過大推定の傾向は緩和された（RMSE 平均：1.05 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, PBIAS 平均：10.96%）。

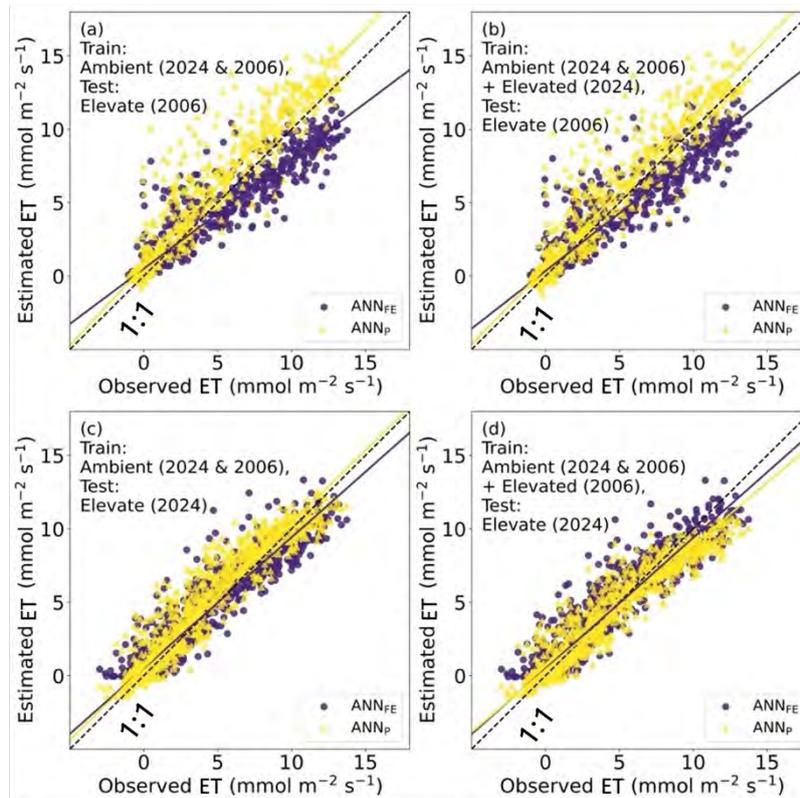


図2 ETの観測値と推定値を表した散布図。紫丸はANN<sub>FE</sub>、黄三角はANN<sub>P</sub>による推定値を示す。各図は異なる学習 (Train)・テスト (Test) データセットの組み合わせを表す。(a) Train: A, Test: E06; (b) Train: A+E24, Test: E06; (c) Train: A, Test: E24; (d) Train: A+E06, Test: E24。

(A: 2024年 + 2006年 Ambient区データ, E06: 2006年 Elevated区データ, E24: 2024年 Elevated区データ)

ANN<sub>FE</sub>がいずれの学習データにおいても Elevated 区ETを精度よく推定できた理由として、作物の生理学的メカニズムと群落構造の双方をANNモデルに学習させたことが挙げられる。第一に、 $Tr_L$ をANN<sub>FE</sub>の入力変数としたことが起因していると考えられる。 $Tr_L$ は気孔コンダクタンスモデルを介して推定されている。そのため、高CO<sub>2</sub>環境下で生じる気孔閉鎖に伴う蒸散抑制をANNモデルに学習させることができ、高い推定性能を示したと考える。第二に、個葉スケールの $Tr_L$ では表現しきれない群落構造の情報を、LAIの入力によりモデルに学習させたことも、高い推定性能の実現に寄与している。図3に、CO<sub>2</sub>およびLAIの変化に対するET推定値の感度分析の結果を示す。Ambient区のみで学習した場合(a)、ANN<sub>FE</sub>はElevated区における $Tr_L$ が表す気孔閉鎖に伴うET減少、LAIが表

す葉面積の拡大に伴う ET 増加をそれぞれ捉えた。このような CO<sub>2</sub> 上昇に伴う ET 増減における複雑な相殺効果を ANN<sub>FE</sub> が学習したことで、Elevated 区 ET に対する高い推定性能を示したと考える。

一方で、Ambient 区データのみを用いた推定において、ANN<sub>P</sub> は過大推定の傾向を示した。この理由は、機械学習モデルの一般的な特性である、学習データに含まれない条件のデータを推定する際に、ANN モデルの推定性能が低下するためである。学習データに Elevated 区データを加えた際に、ANN<sub>P</sub> の過大推定は緩和された。この緩和は、Elevated 区学習データの追加により、ANN<sub>P</sub> が CO<sub>2</sub> 上昇とそれに伴う ET 減少の関係を新たに学習したことが起因すると考える。図 3 がこの ANN<sub>P</sub> の学習の変化を示唆しており、Ambient 区のみでの学習による推定結果 (a) では過大推定が見られたが、Elevated 区データを追加した (b) では過大推定の傾向が緩和された。

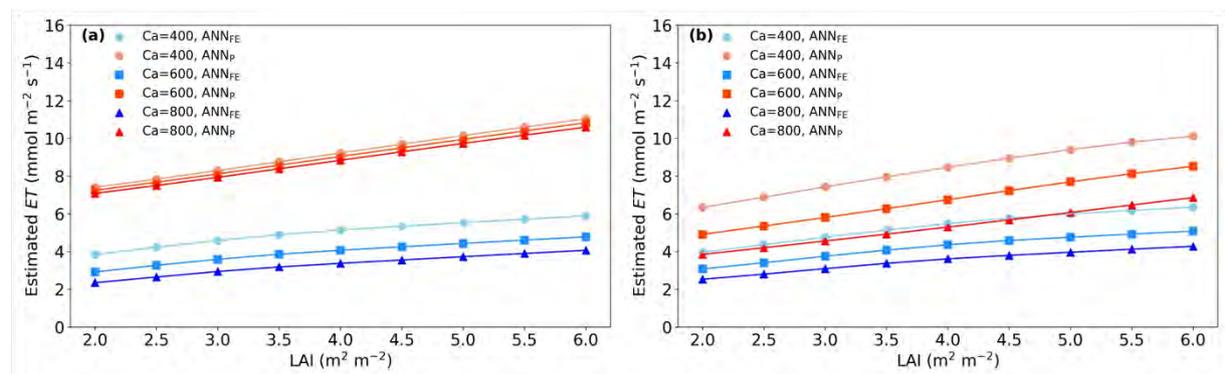


図 3 異なる CO<sub>2</sub>濃度 ( $C_a$ ) および葉面積指数 (LAI) に対する群落蒸発散 (ET) 推定値の応答シミュレーション。3 段階の CO<sub>2</sub>濃度 ( $C_a$ : 400 (○), 600 (□), 800  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  (△)) 条件下における、LAI の変化に対する ET 推定値の応答を示す。推定には、FE を導入していない ANN<sub>P</sub> (赤) と、FE を導入した ANN<sub>FE</sub> (青) の 2 つのモデルを用いた。各図は異なる学習データセットを用いたモデルの結果を示している: (a) Ambient 区 (2006 年および 2024 年), (b) Ambient 区 (2006 年および 2024 年) + Elevated 区 (2006 年)。なお、他入力変数のシミュレーション条件は晴天日の日中を想定した固定値を用いた。

## 6. 結言

本研究では、特徴量エンジニアリング (FE) を導入した ANN<sub>FE</sub> を構築し、高 CO<sub>2</sub> 環境下における作物群落の ET 推定性能を評価した。その結果、ANN<sub>FE</sub> は Ambient 区のみ、そして Ambient 区に加えて Elevated 区を学習データとした推定条件において、高 CO<sub>2</sub> 環境下の ET を一貫して高い精度で推定した。これは、ANN<sub>FE</sub> が FE を通じて導入した生理学的なメカニズムと、LAI が示す群落構造を学習したことに起因している。一方で、実測データを直接入力した ANN<sub>P</sub> では、Ambient 区のみでの学習では過大推定が見られたものの、Elevated 区のデータを学習データに加えることでその傾向が緩和された。これらの結果は、ANN<sub>P</sub> の推定精度が学習データの範囲に依存する一方で、ANN<sub>FE</sub> は未学習の環境でも高い推定性能を示すことを示唆している。以上の結果から、本手法は高 CO<sub>2</sub> 濃度下における水資源管理において、新たな ET 推定手法としての可能性を示した。

# Analysis of human dental pulp stem cell behavior on nanocellulose scaffolds with distinct surface functional groups

Laboratory of Bioresources Chemistry, Akihiro Iwasaki

## 1. Introduction

Dental tissues play essential roles in daily life; however, tooth damage and loss due to dental caries are extremely common. Moreover, human teeth exhibit limited regenerative and restorative capability. In recent years, dental pulp stem cells (DPSCs) have attracted attention for tooth tissue regeneration. DPSCs can be easily collected from baby teeth and wisdom teeth, exhibit remarkable proliferative capacity, and are capable of differentiation into various cell types. *In vitro* culture of DPSCs typically employs extracellular matrix (ECM) components such as animal-derived collagen and hyaluronan, as well as autologous dental materials. Nevertheless, animal-derived components still pose challenges including immunogenicity and lot-to-lot variability. Wood-derived cellulose nanofiber (CNF) has emerged as a potential alternative material. Previous studies reported that phosphorylated CNF (P-CNF) induced hard tissue differentiation in immortalized human DPSCs even in the absence of chemical inducers, likely due to their collagen-like fibrous morphology and the presence of phosphate groups that promote calcification<sup>[1]</sup>. Other studies demonstrated that TEMPO-oxidized CNF (TOCNF) supported adhesion and proliferation of mouse fibroblasts and human mesenchymal stem cells by structurally mimicking the ECM<sup>[2,3]</sup>. Based on these findings, the present study aimed to evaluate the adhesion, proliferation, and hard tissue differentiation of immortalized and primary human DPSCs on CNF scaffolds with distinct surface functional groups, including carboxy groups (TOCNF) and phosphate groups (P-CNF).

## 2. Materials & methods

### 2.1 Preparation of substrates

In this study, unmodified CNF (BiNF-i-s, standard length; Sugino Machine Ltd.), TOCNF1.47 (COO<sup>-</sup>: 1.47 mmol/g; Nippon Paper Industries Co., Ltd.), and P-CNF0.76 and P-CNF1.48 (phosphate contents: 0.76 and 1.48 mmol/g; Oji Holdings Corporation) were used. CNF film substrates for cell culture were prepared by casting aqueous dispersions adjusted to 0.25 wt% onto 24-well plates or 15-mm-diameter cover glasses, followed by drying at room temperature and sterilization using 99.5% EtOH and UV irradiation. Rat tail-derived type I collagen (COL1) and tissue culture polystyrene (TCPS) were used as control substrates.

### 2.2 Characterization of nanofiber and substrates

The morphology of each nanofiber was observed using atomic force microscopy (AFM), and fiber length ( $n = 35$ ) and fiber width ( $n = 50$ ) were calculated from the AFM images. The fibers used were subjected to crystallinity measurement by X-ray diffraction (XRD) and zeta potential measurement by a Zetasizer apparatus. The wettability of the substrate surface was evaluated by measuring the water contact angle (WCA) using the sessile drop method. The substrate surface was observed by AFM in air and at room temperature. The surface roughness ( $R_a$ ) was determined from the acquired AFM images. To evaluate film stability, the film was observed before and after immersion in culture medium for 72 hours using a 3D laser microscope, and the film thickness was calculated.

### 2.3 Cell culture assay

Immortalized human DPSCs (Tet-off K4DT hDPSCs)<sup>[4]</sup>, established by Orimoto *et al.*, and primary human

DPSCs (DP006; donor: female, 16 years old)<sup>[5]</sup>, purchased from RIKEN Cell Bank, were used. Cells were seeded onto the prepared film substrates and incubated them under conditions of 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cell morphology, adhesion behavior, and proliferation were evaluated using calcein-AM and propidium iodide (PI) for live/dead cell staining, and Cell Counting Kit-8 (CCK-8) for quantification of viable cells. After 72 hours of culture, the medium was replaced with differentiation medium containing 10% FBS and chemical inducers, and maintained for 2–3 weeks. Hard tissue differentiation behaviors were evaluated by Alizarin Red S (ARS) staining, which labels calcium deposited in red. All results are presented as mean ± standard deviation (SD), and the sample size (*n*) represents the number of independent replicates.

### 3. Results & Discussion

#### 3.1 Characterization of nanofibers and substrates

Morphological observation of the nanofibers used was performed using AFM. Distinct nanofiber morphologies were clearly observed in all AFM images (Fig. 1, upper). Unmodified CNF consisted of a mixture of individual nanofibers and thicker bundled fibers, with an average fiber width of approximately 10 nm. In contrast, TOCNF and P-CNF, whose each surface was modified with acidic functional groups, exhibited

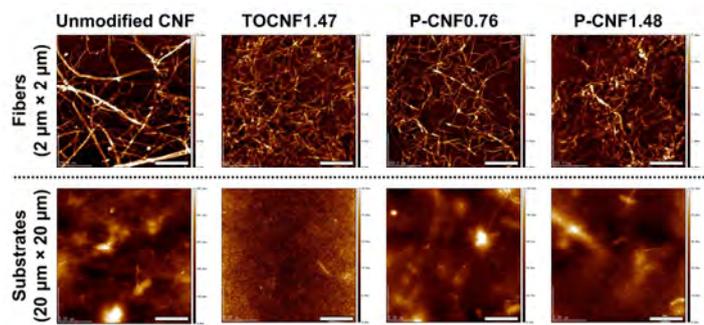


Fig. 1. AFM images of unmodified CNF, TOCNF1.47, P-CNF0.76, and P-CNF1.48. Upper panels: nanofiber morphology (scale bars: 500 nm). Lower panels: substrate surfaces (scale bars: 5 μm).

uniform nanofibers with an average width of approximately 3 nm. Zeta potential measurements were conducted using CNF dispersions prepared in phosphate buffer at pH 7.4 (*n* = 6). Surface modification increased the negative surface charge, suggesting improved nanoscale dispersion due to enhanced electrostatic repulsion. Crystallinity was evaluated by XRD analysis. Unmodified CNF exhibited high crystallinity (74.8%) with a typical cellulose type I crystalline structure. TOCNF1.47 and P-CNF0.76 showed slightly reduced crystallinity while maintaining the characteristic crystalline structure of cellulose type I. In contrast, P-CNF1.48, which contained a higher phosphate content, exhibited significantly reduced crystallinity, decreasing to 47.6%. The properties of the nanofibers and the film substrates are summarized in Table 1.

Table 1. The sample characterization data of CNF and film substrates.

Sample	Unmodified CNF	TOCNF1.47	P-CNF0.76	P-CNF1.48
Fiber length (μm)	0.60 ± 0.18	0.53 ± 0.22	0.83 ± 0.22	0.75 ± 0.22
Fiber width (nm)	11.1 ± 5.13	3.52 ± 1.01	3.67 ± 1.04	2.71 ± 0.81
Zeta-potential (mV)	-17.6	-42.9	-36.5	-37.7
Crystallinity (%)	74.8	64.1	63.9	47.6
Surface roughness (nm)	74.8	4.94	15.0	8.99
Water contact angle (°)	23.9 ± 0.4	37.0 ± 4.1	37.6 ± 0.4	43.4 ± 3.8
Thickness_0 h (μm)	1.72 ± 0.08	2.63 ± 0.31	3.67 ± 0.20	2.58 ± 0.19
Thickness_72 h (μm)	1.96 ± 0.81	1.83 ± 0.42	3.35 ± 0.31	3.07 ± 0.26

The prepared unmodified CNF films appeared cloudy, whereas all surface-modified CNF films were transparent. The substrate surfaces were analyzed using AFM, and surface roughness values were calculated (**Fig. 1, lower**). Surface modification resulted in significantly smoother films, attributable to the drastic reduction in nanofiber sizes. In particular, TOCNF1.47 film showed almost no fiber aggregation. The water contact angle of the substrate improved following surface modification ( $n = 10$ ), likely due to the reduced surface roughness. A contact angle of approximately  $70^\circ$  is considered favorable for cell adhesion and the water contact angle of TCPS was  $74.0^\circ$ . Film thickness was measured using a 3D laser microscope before immersion in culture medium and after 72 hours of immersion ( $n = 9$ ). All CNF substrates formed thin films approximately  $1\text{--}4\ \mu\text{m}$  in thickness, confirming their high stability, which is attributed to the extensive hydrogen bonding characteristic of CNFs.

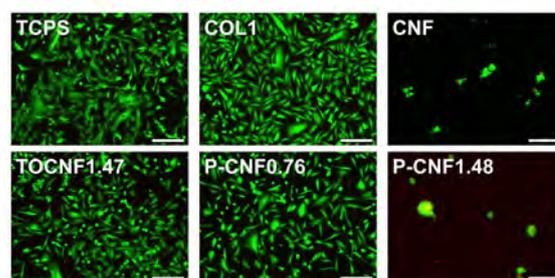
### 3.2. Cell culture of immortalized human DPSCs

Immortalized human DPSCs were cultured for 72 hours on CNF substrates with distinct surface functional groups (**Fig. 2**). On the control substrates, TCPS and COL1, the cells adhered, spread, and proliferated normally. In contrast, no adhesion occurred on unmodified CNF, and the cells formed spheroids. TOCNF1.47 and P-CNF0.76 supported cell adhesion and spreading, whereas P-CNF1.48, which contained a higher phosphate content, again failed to support adhesion and showed increased cell death. Because cellulose is bioinert, these results indicate that the introduction of suitable amounts of functional groups enables CNFs to function as bioadaptive substrates. Quantification of viable cells was consistent with the live/dead cell staining results. Although TOCNF and P-CNF supported similar adhesion morphologies, the number of adhered cells differed significantly, indicating differences in adhesive and proliferative capacity depending on the types and amounts of acidic functional groups. This trend has been reported for multiple cell type<sup>[1–3]</sup>. Although the detailed mechanisms governing the interactions between surface-modified CNFs and cells remain unclear, factors such as surface wettability, crystalline surface charge affecting protein adsorption, nanofiber aggregation states, and crystalline structure are likely involved.

Following a previous report<sup>[4]</sup>, hard tissue differentiation was induced in immortalized human DPSCs. Cells were induced for 14 days on the control substrates (TCPS and COL1) and on the TOCNF1.47 and P-CNF0.76 substrates, and calcium deposition was evaluated by ARS staining. Under induction conditions, cell aggregation and localized red staining were observed on both TOCNF1.47 and P-CNF0.76. Differences in cell morphology and spreading behavior were also observed between both CNF substrates. In contrast, no notable changes were observed on TCPS or COL1, making the results difficult to interpret and indicating the need for further investigation.

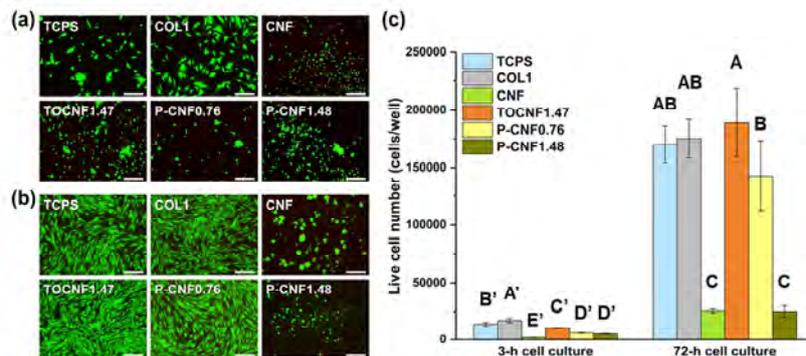
### 3.3. Cell culture of primary human DPSCs

Primary human DPSCs were cultured on the same substrates for 3 and 72 hours to evaluate initial adhesion and subsequent proliferation (**Fig. 3**). After 3 hours, non-adherent cells were removed with PBS, and the remaining cells were assessed as initially attached cells. On TCPS and COL1, cells adhered efficiently and showed spreading. In



**Fig. 2.** Live/dead staining images of Tet-off K4DT cells cultured on different substrates. Live cells (green), dead cells (red), scale bars:  $200\ \mu\text{m}$ .

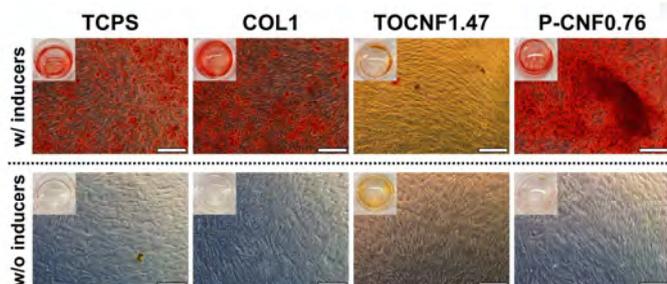
contrast, all CNF substrates supported only limited initial adhesion, and most cells remained round, indicating differences in adhesion mechanisms on the CNF scaffolds. After 72 hours, adhesion behavior was comparable to that of immortalized human DPSCs. TOCNF1.47 supported a viable cell number comparable to the controls, whereas P-CNF0.76 also allowed cell growth but at a lower level than



**Fig. 3.** (a, b) Live/dead staining images of DP006 cells on different scaffolds for 3 h cell culture (a) and 72 h cell culture (b). Live cells (green), dead cells (red), scale bars: 200  $\mu$ m. (c) Live cell number of 3 h and 72 h using CCK-8. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ,  $p < 0.05$ , Tukey test.

TOCNF1.47. TOCNF is highly likely to provide an environment close to that found in living organisms by structurally mimicking ECM components such as collagen fiber and hyaluronan.

After 23 days of induction, the control substrates TCPS and COL1 showed clear calcium deposition, indicated by red staining under inducer-containing conditions (**Fig. 4**). In contrast, TOCNF1.47 showed only faint staining, with minimal detectable calcium deposition. However, P-CNF substrates displayed dark red aggregates, likely representing clusters of cells, distributed throughout the wells, along with substantial calcium accumulation. No staining was observed on any substrates under cell-free conditions, indicating that the coloration resulted from cellular activity. These findings suggest that the phosphate groups on P-CNFs may serve as nucleation sites for calcification, thereby promoting hard tissue differentiation of primary DPSCs.



**Fig. 4.** Alizarin Red S staining images of DP006 cells on different scaffolds after 23 days induction with differentiation inducers (upper), and without inducers (lower), scale bars: 200  $\mu$ m.

## Conclusion

In this study, the effects of surface functional groups on CNF-based materials were investigated to clarify their influence on human DPSC behavior. The findings demonstrate that both the type and the quantity of functional groups modulate DPSCs adhesion. TOCNF appears to enhance DPSC proliferation, whereas P-CNF may promote hard tissue differentiation. Further studies are required to elucidate the mechanisms underlying DPSC responses to surface-modified CNFs. A comprehensive evaluation of cell behavior on CNF scaffolds is expected to contribute to the development of novel tissue engineering strategies based on agricultural science.

## References

- [1] Iwasaki A., *et al.*, *Carbohydr. Polym.*, **2025**, 359, 123593; [2] Kai R., *et al.*, *Carbohydr. Polym.*, **2024**, 343, 122479; [3] Hatakeyama M. & Kitaoka T., *Cellulose*, **2022**, 29, 2869–2883; [4] Orimoto A., *et al.*, *Cell Biochem. Funct.*, **2024**, 42, e4064; [5] Tamaoki N., *et al.*, *J. Dent. Res.*, **2010**, 89, 773

# Rab タンパク質及び植物 RNA 編集タンパク質の分子機構解明を目指した立体構造解析

生物物理化学研究室 漆原良太

## 1. 要旨

Rab タンパク質および植物 RNA 編集タンパク質は、細胞内膜輸送制御や遺伝情報の多様化を担う重要因子であり、細胞機能恒常性の維持に不可欠である。本研究では、X 線結晶構造解析に基づき、カイコ由来 RabX6 および植物由来 RNA 編集酵素の基質複合体立体構造を決定し、GTP 結合・加水分解に伴う構造変化機構と標的 RNA 塩基認識様式を明らかにした。これらにより、小胞輸送制御および RNA 編集制御の分子基盤の理解が大きく進展し、将来的な作物改良や昆虫制御、創薬への応用が期待される。

## 2. GDP 結合型 *BmRabX6* の結晶構造解析

### 【背景】

Rab GTPase は GDP と GTP の交換によって細胞内の小胞輸送を制御する分子スイッチであり、昆虫には独自の RabX ファミリーが存在する。カイコの RabX6 (*BmRabX6*) は、精巣の発達や神経ペプチドの分泌に関与することが示唆されており、その生理的役割は重要である。しかし、一般的な Rab ファミリーで GTP 加水分解に必要とされる触媒 Gln 残基を *BmRabX6* は Met 残基に置換されており、その構造や GDP-GTP サイクルの制御メカニズムは未解明である。本研究は、昆虫特有の RabX として初の構造決定を行い、その分子メカニズムを解明することを目的とした。

### 【方法】

C 末端 16 残基を欠損させた *BmRabX6* を大腸菌で発現させ、各種クロマトグラフィーによって精製した。GDP および  $Mg^{2+}$  との共結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法で行い、X 線回折実験は SPring-8 にて実施した。位相決定は Phaser を用いた分子置換法により行い、モデル構築には Coot、構造精密化には phenix.refine を使用した。また、機能的相互作用パートナーを予測するために AlphaFold3 を用いた複合体モデリングを実施した。UniProt 等のデータベースから候補を絞り込み、相互作用界面の信頼性指標 (EPE や pLDDT) や活性中心の立体配置を評価することで、*BmRabX6* と相互作用する潜在的な GAP (GTPase 活性化タンパク質) 候補を探索した。

### 【結果・考察】

本研究では分解能 3.1 Å で GDP 結合型 *BmRabX6* の結晶構造を決定した。*BmRabX6* は、6 つの  $\beta$  ストランドと 4 つの  $\alpha$  ヘリックスからなる典型的な小型 GTPase フォールドを採用しておりヌクレオチド結合部位には GDP と  $Mg^{2+}$  に相当する電子密度が観察された。また、一般的な GTP 加水分解触媒 Gln 残基に相当する位置に存在する Met69 はヌクレオチド結合から離れた位置に配置されていた。この構造的特徴は、*BmRabX6* が内在的な

GTPase 活性を欠き、GAP タンパク質に完全に依存している独自の制御機構を有することを示唆している。そこで、AlphaFold3 による相互作用因子探索を実施し、GAP 候補 *BmH9J2P5* が RabX6 と複合体を形成する可能性を見出し、触媒 Gln 残基が供給されるメカニズムが示唆された。

さらにエフェクター結合面において、保存性の高い三つの疎水性残基の一つがヒスチジン (His47) に置換されており、これは、従来のような疎水性相互作用主体の結合から、親水性や電荷を介した相互作用様式へと移行している可能性を示唆している。これらの構造的適応は、昆虫の精巣や神経系といった環境において、非標準的なエフェクター因子と相互作用する戦略である可能性がある。本研究は、戦略的なアミノ酸置換がいかに関与するかに Rab の機能を多様化させ、昆虫特有の生理要求に適応させているかを示す重要な知見を提供する。

### 3. 植物オルガネラで起こる C-to-U 型 RNA 編集の分子基盤

#### 【背景】

植物オルガネラ（ミトコンドリアや葉緑体）では mRNA 上のシトシン (C) 塩基がウラシル (U) 塩基へと置換される C-to-U 型 mRNA 編集が行われる。この塩基置換反応により、ゲノム情報とは異なるアミノ酸コードへと変換され、植物オルガネラの正常なタンパク質機能が発現する。この編集を担う酵素 PPR-DYW は、基質 mRNA を配列特異的に認識する PPR (Pentatricopeptide repeat) ドメイン、塩基置換反応を担う DYW ドメイン、そしてこれら二つのドメインを繋ぐ E (Extension) ドメインで構成される。PPR ドメインによって認識される塩基から正確に 4 塩基下流の標的 C 塩基を、DYW ドメインが U 塩基へと変換する。しかし、PPR-DYW がどのような分子メカニズムで厳密な mRNA 編集を行っているのか不明な点が多い。本研究は PPR-DYW/mRNA 複合体の立体構造解析と変異体 PPR-DYW を用いた mRNA 編集効率測定により、厳密な C-to-U 型 mRNA 編集の分子メカニズム解明を目指した。

#### 【方法】

大腸菌組換えタンパク質として PPR-DYW を発現させ、各種クロマトグラフィーを用いて精製した。基質 RNA との共結晶化はシッティングドロップ蒸気拡散法で行い、X 線回折実験は SPring-8 にて実施した。位相決定は Phaser を用いた分子置換法により行い、モデル構築には Coot、構造精密化には phenix.refine を使用した。基質 RNA から逆転写した cDNA をサンガーシーケンス解析し、T/C ピークの面積比から編集効率を算出し、構造情報に基づく変異体解析を実施した。

#### 【結果・考察】

本研究では、全長 PPR-DYW の基質 RNA との複合体立体構造を X 線結晶構造解析により分解能 2.7 Å で決定した。結晶構造から各ドメインの空間的な構造配置、RNA 認識様式、そして触媒反応メカニズムが明らかになった。PPR ドメインは標的 RNA 配列をモジュール方式で特異的に認識し、E ドメインは PPR ドメインと DYW ドメインを物理的に連結す

るだけでなく、標的 C 塩基上流の RNA を C-to-U 編集のために適切なコンフォメーションで収容し、DYW ドメイン中の活性部位に正確に標的 C 塩基を配置させている。活性部位には、 $Zn^{2+}$  と標的塩基の電子密度が観測できた。この構造情報より、DYW ドメインは、 $Zn^{2+}$  に配位する水分子を活性化して、標的 C 塩基のアミノ基に対して、加水分解脱アミノ化反応を触媒して U 塩基を生成すると考えられる。加えて、変異体 PPR-DYW を用いた RNA 編集効率測定により、3 ドメイン間相互作用の重要性が確認され、活性残基以外にも正確な RNA 編集反応に重要な残基を複数同定することができた。これらの情報から、3 つのドメインの協働的な働きによって、標的 RNA の厳密な位置特異的 C-to-U 編集が行われることが明らかとなった。

#### 4. 結論

本研究は昆虫特異的 RabX6 および植物オルガネラ RNA 編集酵素 PPR-DYW という進化的に多様化した二つの制御因子について、基質結合状態の結晶構造を決定し、それぞれの分子機構を構造基盤から明らかにした。GDP 結合型 *BmRabX6* の構造解析により、触媒 Gln 残基の Met 置換という特徴的変異が内在的 GTPase 活性の低さと関連し、GAP 依存的な制御機構を採用している可能性が示唆された。また、エフェクター結合面のアミノ酸置換は、昆虫特有の相互作用様式への適応を反映する構造的基盤を提供した。一方、PPR-DYW/RNA 複合体構造からは、PPR・E・DYW 各ドメインの協働によって標的 RNA 塩基が活性中心の最適な位置に配置されることで、厳密な位置特異性が達成される構造基盤を明らかにした。また、生化学的解析によって正確な RNA 編集反応に重要な残基を複数同定した。本研究の成果は、昆虫内小胞輸送および植物 RNA 編集の分子制御機構の詳細な構造情報を提供するものであり、昆虫生理機能の制御技術、新規塩基置換型 RNA 編集技術の開発に貢献することが期待される。

## 老化促進モデルマウスを用いたジペプチド Tyr-Pro の学習記憶改善作用に関する研究

食品分析学 修士2年 市場優香

当研究室ではこれまでに、大豆タンパク質由来のジペプチド Tyr-Pro (YP) が経口投与後ペプチド体として血液脳関門を透過し、マウス脳実質の特定領域に蓄積することを報告してきた<sup>1)</sup>。また、アミロイドβ (Aβ) 注入による急性アルツハイマー型認知症モデルマウスにおいて、経口投与した YP が脳機能改善作用を示すことを明らかとしている<sup>2)</sup>。そこで本研究では食品としての継続的な摂取を想定し、老化促進モデルマウス SAMP8 を用いて、YP の長期経口摂取による学習記憶改善作用の評価および機序解明を目的とした。

16 週齢雄性 SAMP8 マウスを用いて、コントロール群、YP 群 (0.01%) およびアミノ酸群 (Tyr+Pro, 各 0.005%) を設定した。また、正常群として SAMR1 マウスを用い、AIN-93M に準拠した飼料を用いて 25 週間飼育した。41 週齢時にモリス水迷路試験による空間学習記憶評価を実施した。その結果、SAMP8 (コントロール群) において、SAMR1 (正常群) と比較して明らかな逃避潜時の延長 (正常群  $30.7 \pm 6.2$  s, コントロール群  $97.2 \pm 8.4$  s,  $p < 0.05$ ) が認められ、空間学習記憶の低下が確認された。一方 YP 群では、コントロール群と比較して、逃避潜時が明らかに短縮 (YP 群  $65.4 \pm 11.8$  s,  $p < 0.05$ ) し、YP の長期経口摂取による空間学習記憶改善作用が認められた。また、当該作用はアミノ酸群では認められなかったことから、YP 摂取による学習記憶の改善作用はペプチド体としての機能であることが示された。

以上より、本研究において、脳移行ペプチド YP の長期経口摂取は、SAMP8 マウス脳海馬の BACE1 の発現量減少および IDE の発現量増大による可溶性 Aβ<sub>(x-42)</sub>量の減少を介した空間学習記憶改善作用を有することが明らかとなった。今後は神経細胞を用いて、YP の認知機能改善作用の詳細な機序解明を *in vitro* にて行う予定である。

1) Cheng L. *et al. Sci. Rep.* 13, 16908 (2023)

2) Tanaka M. *et al. npj Sci. Food* 4, 7 (2020)

氏 名 : 野崎 翼

論 文 名 : Systematics and Evolution of the Myrmecophilous *Homoeusa* Genus Complex (Coleoptera: Staphylinidae: Aleocharinae)

(好蟻性ヒラタアリヤドリ属群 (甲虫目: ハネカクシ科: ヒゲブトハネカクシ亜科) の分類と進化)

区 分 : 甲

### 論 文 内 容 の 要 旨 (要 約)

アリのコロニーには、多種多様な利用者 (好蟻性生物) が存在し、特殊な生物間相互作用の研究材料として注目されている。アリに依存した生活様式は、様々な系統群で繰り返し独立に進化してきたとされる。なかでもハネカクシ科ヒゲブトハネカクシ亜科では、この生活様式が 40 回以上にわたって独立に獲得してきたとされ (Parker 2016)、繰り返し起きた収斂進化の背景にある前適応的性質や遺伝基盤等についての研究も進められている (Narragon et al. 2022)。好蟻性獲得後の進化についても、一定の共通性や法則性が存在することが予想されるが、好蟻性系統における進化パターンに関する研究は、DNA サンプルや生態情報の収集の困難さから一部の分類群に限られている現状がある。また、それらの種多様化を促進しうる重要な要因として、寄主転換が挙げられている (Hlaváč et al. 2021) が、寄主転換によって駆動された種分化の詳細な過程が示された例はほとんど存在しない。

本研究では、こういった問題に洞察を与えうる研究材料として、好蟻性ハネカクシの一群であるヒラタアリヤドリ属群 *Homoeusa* genus complex (Maruyama 2009, 以下 HGC) に着目した。本属群は、比較的種多様性の概要を把握しやすい全北区地域に分布すること、グループ内の全種が好蟻性種で、各種が高い寄主特異性を持つと予想されることから、寄主転換をはじめとした好蟻性獲得後の進化パターンを研究するための理想的な研究材料である。本属群の進化パターンを理解するため、本論文の各章に対応する 4 つの段階と目的を設定した。(1) 全北区における種多様性の全貌を把握し、各種の生態情報について整理する。(2) 分子系統学的手法によって、本属群の単系統性を確認し、全体の系統関係と進化史を再構築するとともに、属分類体形の再検討および形態による種分類の妥当性を検証する。(3) 寄主転換を伴う種分化が現実的に起こりうるのかを集団遺伝学的手法による解析により検証する。(4) 上記の結果を総合して、本属群の種多様化要因を考察すること。

第 1 章では、九州大学総合研究博物館の収蔵標本を中心に、6 カ国 21 施設に所蔵された標本および個人所蔵標本を材料として形態形質の詳細な検討を行った。その結果、18 新種を含む合計 6 属 40 種が確認された。ここには、HGC としてこれまで近縁関係に言及がなかった 3 属を含んでいる。また、寄主アリの整理によって、ケアリ属を寄主とする種では、1 種の例外を除き、寄主範囲がケアリ属の 1 種群に収まることが示された。

第 2 章では、全北区の 6 カ国から全種数の 70%にあたる 28 種 (全種数の約 70%) の DNA サンプルを収集し、最尤法およびベイズ法による系統推定、分岐年代推定、寄主アリ - 共生者関係の進化史推定のための *cophylogeny* 解析および祖先形質復元を実施した。その結果、5 属を含む HGC の単系統性が確認され、ヤマアリ亜科 *Formicinae* のケアリ属 *Lasius* だけではなく、一部の種では

カタアリ亜科 Dolichoderinae のツヤハダアリ属 *Liometopum* を寄主とすることが明らかになった。HGC の初期の多様化にはケアリ属の多様化が関与しており、中新世後期以降ではケアリ属内の種群レベルの寄主転換が繰り返されており、その背景にはケアリ種間の一時的な社会寄生が関連している可能性が示唆された。また、既存の属の識別に用いられていた形態形質は同形形質やごく一部の種の固有派生形質であることが判明し、5 属を *Homoeusa* の新参異名とする分類学的処置を提案した。さらに、21 種中 18 種で形態種の単系統性が支持され、第 1 章の形態にもとづく種分類の妥当性がおおむね示唆された。

第 3 章では、ヒラタアリヤドリ種群 *Homoeusa prolongata complex* を材料に約 150 個体からミトコンドリア 16S 領域とゲノムワイド SNPs を用いた集団遺伝学的解析によって、寄主転換を伴う生態的種分化が好蟻性ハネカクシではじめて検討された。クラスタリング解析や遺伝子流動解析の結果は寄主転換に伴う生態的種分化を支持するパターンだった。また、寄主転換を起こした形態種の多系統性が示され、平行進化または集団間の混合などの複雑な進化過程を経験している可能性が示唆された。

第 4 章では、ここまでの結果を総括して、HGC の種多様化要因に関して議論を行った。シラミ類などの体表寄生者などで多くみられる寄主の種分化と同期した共種分化 (Light and Hafner 2007) は、HGC 内ではほとんど見られなかったが、一方で寄主転換はより多く繰り返されたことが示された。また、HGC の新北区産種が 2 系統存在することや近縁種間で重複のない地理的分布範囲を示す例や、地理的障壁が種分化に果たした影響の大きさを示唆している。総合すると、主要な寄主であるケアリ属における多様化を背景として、種群レベルの寄主転換と地理的障壁が組み合わせり、全体の種多様性を形成したと結論付けられる。

氏 名：永江 葉奈

論文題名：九州北部におけるスジシマドジョウ類の分布・生態・遺伝的特性に関する研究

区 分：甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

ドジョウ上科は、コイ目に属し、世界で 1050 種以上が知られており、体型や生態の多様性からさまざまな環境に適応してきた原始的なグループである。ドジョウ上科は 9 科に分類され、日本には 3 科が自然分布する。そのなかでも、最も種数の多いドジョウ科は 3 属 26 種・亜種が知られている。本論文の対象亜種が属するシマドジョウ属は、体側に斑紋列を有すること、可動式の眼下棘を有すること、雄が胸鰭基部に骨質盤を有するなどの特徴をもつ。日本では 19 種・亜種が分布し、形態や分布に基づき 4 種群に分類される。なかでも、スジシマドジョウ種群は分類が複雑で、近年の研究により、ナミスジシマドジョウ *Cobitis striata* として 3 亜種（チュウガタスジシマドジョウ、オンガスジシマドジョウ、ハカタスジシマドジョウ）に分類された。チュウガタスジシマドジョウは 3 亜種の中では最も広域分布であり、瀬戸内海に流入する河川と一部の日本海流入河川に生息するが、オンガスジシマドジョウとハカタスジシマドジョウは九州北部の限られた地域に分布する。これらの分布域は、地理的障壁によって隔てられている。特に、九州北部に固有な 2 亜種の生息域は都市化や河川改変により環境が悪化しており、オンガスジシマドジョウが絶滅危惧 IB 類 (EN)、ハカタスジシマドジョウが絶滅危惧 IA 類 (CR) および種の保存法で国内希少野生動植物種と福岡県の希少野生動植物種に指定されている。これらの保全には生活史や遺伝構造、生息環境の解明が不可欠である。そこで本論文では、九州北部に生息するナミスジシマドジョウ 2 亜種（オンガスジシマドジョウおよびハカタスジシマドジョウ）の生態・生活史情報、遺伝的特性を明らかにすることを目的とした。

第 2 章では、九州北部から収集したナミスジシマドジョウの遺伝的関係をミトコンドリア DNA の 2 領域 (cyt *b* および D-loop) を用いて調べた。その結果、系統解析により 2 つのクレードに分類された：クレード I (チュウガタスジシマドジョウとオンガスジシマドジョウ) とクレード II (ハカタスジシマドジョウ)。分子分散分析によって、オンガスジシマドジョウとハカタスジシマドジョウは、地点間で有意な遺伝的分化が認められた。ハプロタイプネットワーク解析ではいずれもボトルネック型の樹形を示した。中立性検定 (Tajima's *D*; Fu's *F<sub>s</sub>*) では、オンガスジシマドジョウとハカタスジシマドジョウともに統計的有意性を示さなかったが、ミスマッチ分布分析では複数の個体群で多峰性分布が認められ、集団拡大モデルから有意に逸脱していた。

第 3 章では、オンガスジシマドジョウの基本的な生活史情報を明らかにするため、遠賀川水系内の 1 支川で毎月野外調査を実施した。各調査で採捕した個体を性別ごとに体長頻度分布で整理し、月毎の体長組成、推定集団サイズ、年級群の平均体長を推定した。さらに、個体数推定および移動性把握のため、標識再捕獲法を用いた調査も実施した。その結果、雌では 2-3 峰、雄では 2 峰となり、オンガスジシマドジョウの成熟年齢は雌雄ともに 1 歳で、寿命は雌が最大 3 年、雄が約 2 年であることが示唆された。卵・仔魚の出現時期より、本調査地におけるオンガスジシマドジョウの産卵期は 5 月下旬頃から 8 月上旬頃であると推測された。推定個体数は

季節により変動し、数十メートルの移動が複数個体で確認されたことから、オンガスジシマドジョウの高い定住性が示唆された。

第4章では、排卵誘発剤を用いた繁殖実験下においてオンガスジシマドジョウとハカタスジシマドジョウの繁殖行動両亜種の繁殖行動を記録した。その結果、両亜種の繁殖行動は類似しており、以下の5段階に行動を区分した。段階1（追尾）：遊泳する雌を単独または複数の雄が追いかける；段階2（接近・並泳）：雄は雌の胸鰭または腹鰭付近に頭部を近づけながら雌と平行に泳ぎ、雌が静止すると胸鰭付近を頭部でつつく；段階3（抱接）：雄が雌の背鰭付近に尾部側から巻き付く；段階4（放卵）：抱接が終わる直前に雌が体を震わせながら放卵する；段階5（離脱）：雌に巻き付いていた雄が離れる。観察されたオンガスジシマドジョウとハカタスジシマドジョウの繁殖行動は、ドジョウおよびシマドジョウ属で報告のあるほかの種・亜種と類似することが明らかとなった。

第5章では、第4章で得られたオンガスジシマドジョウの卵・仔稚魚を用い、発育段階ごとの卵・仔稚魚の形態を記載した。その結果、受精卵は直径2.1–2.3 mm、卵黄径1.0–1.1 mmの沈性卵で、卵膜表面に弱い粘性があり、半透明で色素胞や油球は認められなかった。孵化仔魚（全長4.0–4.5 mm TL）は筋節数27–28 + 17–18 = 44–45（胸鰭から肛門中央部までの筋節数26–27）で、2対の短い外鰓弁と小さな胸鰭をもち、眼にわずかな黒色素胞が確認された。脊索屈曲は5.1–6.8 mm TLで開始し、10.0 mm TLで完了した。20.0 mm TL以上で、各鰭の鰭条数が定数に達した。仔魚の体側の模様は不明瞭であり、約30 mm TLで点列となった。膜状の鰭は胸鰭、尾鰭、背鰭、臀鰭、腹鰭の順に、鰭条は尾鰭、背鰭、臀鰭、胸鰭、腹鰭の順にそれぞれ形成された。また、5.1–7.5 mm TLの個体の体側に遊離感丘が確認された。オンガスジシマドジョウの卵および孵化仔魚の形態的特徴は、既知のシマドジョウ属魚類と類似していた。同水系に生息するシマドジョウ属魚類とは、稚魚期に明瞭となる尾鰭基部の黒色斑、ドジョウ属魚類とは、背鰭が完全に発達する稚魚期以降の全長に対する背鰭前長の割合によって識別可能であることが示唆された。

第6章では、過去の採捕記録と環境DNA分析技術を用い、オンガスジシマドジョウの分布状況を把握するとともに、各調査手法の結果に基づく分布予測モデルの構築を試みた。近縁亜種で生態学的特徴が類似すると想定されるハカタスジシマドジョウについては、オンガスジシマドジョウの分布データで構築したモデルに博多湾流入河川のGISデータを外挿し、分布予測を試みた。さらに、オンガスジシマドジョウおよびハカタスジシマドジョウの生息地における微生息環境の特定のために、両亜種の生息地で採捕調査と環境情報の計測を行い、生息適地モデルを構築した。その結果、オンガスジシマドジョウについては、採捕データに基づくベストモデルのAUCが最も高く（AUC 0.891,  $P > 0.05$ ）、環境DNA分析結果に基づくベストモデルはAUCが最も低かった（AUC 0.763,  $P > 0.05$ ）。ハカタスジシマドジョウについては、いずれのモデルもAUC 0.7（ $P < 0.05$ ）を超え、一定の予測精度を示した。生息適地推定モデルでは、両亜種の出現に影響する環境要因としては、水深、抽水植物、底質（16.0–2.0 mm）が正の影響を与える一方で、流速が負の影響を与えることが示唆された。

第7章では、これらの研究成果を総合し、ナミスジシマドジョウ2亜種の遺伝的特性（第2章）、オンガスジシマドジョウの生態・生活史（第3–5章）を取りまとめ、遺伝的特性（第2章）、生態（第3章）、分布予測モデルと生息適地推定モデルの結果（第6章）を踏まえて、九州におけるナミスジシマドジョウ2亜種の保全計画を検討した。

氏 名 : 佐藤 忠道

論 文 名 : Effects of forest cover changes on the initiation threshold and magnitude of rainfall-induced landslides  
(森林被覆の変化が豪雨を誘因とする斜面崩壊の発生と規模に及ぼす影響)

区 分 : 甲

### 論 文 内 容 の 要 旨

斜面崩壊は、斜面の上の土砂等が、滑動や流動、その他の複雑な運動によって斜面下方へ移動する現象であり、山地地域において直接的・間接的に社会経済的な損失を引き起こす。わが国は急峻な地形と脆弱な地質構造を有し、東アジアモンスーン地域に属するため、豪雨による斜面崩壊は主要なハザードである。最近の100年間に於いて、わが国では森林被覆と降雨の変化と対応して、斜面崩壊は変化している。これまでの研究では、森林の伐採とその後の植生の回復によって斜面崩壊の発生頻度が変化することが実証されており、森林被覆と斜面崩壊の多時期情報を用いた分析の有効性が指摘されている。一方、森林被覆の変化が斜面崩壊に与える影響を評価する際に、降雨特性の時間的変動の影響はほとんど着目されてこなかった。しかし、 $10^1 \sim 10^3$ 年といった時間スケールにおいて、降雨によって発生する間隙水圧は森林被覆の変化による樹木根系の強度変化と並んで、流域スケールでの斜面安定に強い影響を与える要因である。したがって、森林被覆の変化が斜面崩壊に与える影響を明らかにするためには、森林被覆、降雨、斜面崩壊の多時期情報を統合した実証研究が必要である。そこで本論文では、森林被覆と降雨の変化が表層崩壊の発生と規模に与える影響を明らかにすることを目的とした。本論文は序論(第1章)と結論(第6章)を含む全6章で構成される。第2章では、全国スケールの森林被覆の変化が豪雨を誘因とする斜面崩壊の発生に与える影響を明らかにした。第3章と第4章では、林齢が異なる人工林で発生した表層崩壊の比較(第3章)と森林、降雨、斜面崩壊の長期データを用いた単独地域での時系列分析(第4章)によって、地域スケールの森林被覆の変化が表層崩壊の発生に規模に与える影響を明らかにした。

第2章では、全国規模の森林被覆の変化が洪水や降雨による斜面崩壊に与える影響を明らかにした。国土交通省及び林野庁が公表した洪水・土砂災害と森林に関する統計書から水害面積と蓄積量のデータを収集し、これらをそれぞれ豪雨による斜面崩壊と森林の指標とした。これらのデータに対して時系列解析を実施した。その結果、全国スケールでは蓄積量が31.3億 $m^3$ (124.5 $m^3/ha$ )に達するまでは水害面積は指数関数的に減少したが、それ以上の蓄積量増加では水害面積の減少が見られなかった。この結果は、斜面崩壊の発生防止に必要な蓄積量を調査した先行研究の結果と一致していた。したがって、森林の成熟は豪雨による斜面崩壊の被害を軽減するが、その効果には限界があることが示された。

第3章では、林齢が異なる人工林で発生した表層崩壊の比較によって、地域スケールの森林被覆の変化が豪雨による斜面崩壊の発生と規模に与える影響を明らかにした。若齢林で発生した斜面崩壊として1988年に広島県旧加計町で発生したイベントを、成熟林で発生した斜面崩壊として2017年に福岡県朝倉市で発生したイベントを対象とした。斜面崩壊を引き起こした降雨特性を三段直列

タンクモデルによって推定した。その閾値と発生流木量をイベント間で比較した。その結果、両イベントで三段直列タンクモデルの1段目の貯留量が斜面崩壊を引き起こした降雨特性を示していた。成熟林は若齢林よりも斜面崩壊発生時の降雨特性の閾値と発生流木量が大きかった。これは、森林の成熟は降雨閾値を上昇させることで斜面崩壊発生頻度を減少する一方、極端豪雨によって斜面崩壊が発生した場合は大量の流木の生産によって、その規模を大きくする可能性を示唆する。

第4章では、森林、降雨、斜面崩壊の長期データを用いた単独地域での時系列分析によって、地域スケールの森林被覆の変化が豪雨による斜面崩壊の発生と規模に与える影響を明らかにした。神戸市六甲山系で発生した4つの斜面崩壊イベントの斜面崩壊発生閾値と斜面崩壊頻度-面積分布を比較した。これらの指標を土地利用・土地被覆の変化と関連付けた。その結果、森林被覆の劣化は、斜面崩壊の発生に必要な降雨の閾値を低下させ、小規模斜面崩壊の発生確率を高めることで斜面崩壊の総発生数を増加させることが示された。一方、森林の成熟は降雨閾値を上昇させ、小規模斜面崩壊の発生確率を低下させるが、極端降雨時には大規模斜面崩壊の相対的割合を高めることも明らかになった。

第5章では、森林被覆の変化が表層崩壊の発生と規模に与える影響について総括し、生態系を活用した防災・減災とわが国の斜面崩壊リスク管理への示唆を提示した。本研究は、森林被覆の成熟によって斜面崩壊の発生に必要な降雨閾値が上昇し、その頻度と被害が減少することを示した。同時に、一定水準以上の森林の成熟は、豪雨による斜面崩壊の被害の軽減に寄与せず、極端豪雨イベントの発生時に斜面崩壊の規模の増大（大量の流木を含む斜面崩壊・土石流、サイズが大きい斜面崩壊の発生）を引き起こすことも明らかにした。これらの結果を災害リスク分析の枠組みに位置付け、生態系を活用した防災・減災における森林被覆とその変化の正と負の効果を明確にした。また、わが国の斜面崩壊リスク管理において、成熟した森林被覆の保護に加えて、流木発生を抑制するための択伐や密度管理、成熟林下流におけるハード対策の強化が必要であることを示唆した。

氏 名 : 矢崎 雅菜

論 文 名 : ロジウム触媒を用いる無保護ペプチドジスルフィドへのパーフルオロアリール基・アルシニル基挿入反応と超イオウ・複素環セレン誘導体の合成および機能

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質やペプチド等の生体高分子内のシスチンジスルフィド S-S 結合間に官能基を挿入するジスルフィド架橋法は、生体高分子の高次構造を損なうことなく化学修飾することができ、新たな機能の発現が期待される手法である。しかし、従来のシステイン残基の化学修飾は、システインチオール S-H 結合と化学量論量の塩基から生じたチオラートの高い求核性を利用した反応であり、低極性で強固な共有結合であるシスチンジスルフィド S-S 結合を直接化学修飾した例はない。また、複雑な立体構造を有する生体高分子の化学修飾は、官能基保護を用いず、直截的に水中均一系で行うことが望ましい。アミノ基やカルボキシ基等の多様な反応性官能基を有する無保護ペプチド中で低極性な S-S 結合のみを選択的に化学修飾するための方法論として、本研究では遷移金属触媒反応、特にロジウム触媒反応に着目した。

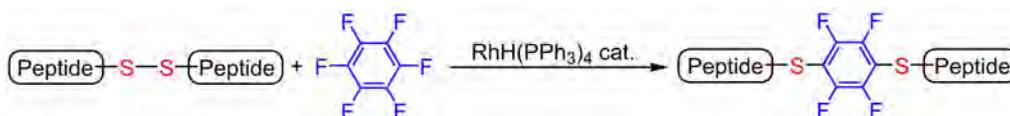
一方、シスチン S-S 結合間にイオウ原子が挿入された S-S<sub>n</sub>-S 構造を有するペプチドポリスルフィドは、生体内に豊富に存在し、抗酸化作用等の多様な機能を有する超イオウ化学種として近年注目されている。このペプチドポリスルフィドを化学修飾することで新たな機能の発現が期待されるものの、無保護ペプチドポリスルフィドを対象とした化学修飾法はこれまでに知られていない。

さらに、イオウと同族の第 16 族元素であるセレンに着目すると、セレノール (RSeH) およびパースルフィド (RSSH) は、チオール (RSH) と比較して小さな pK<sub>a</sub> を有するなど、化学的に類似した性質を示すことから、有機セレン化合物は超イオウ化合物と同様に多様な生物活性や機能発現が期待される。これら有機セレン化合物の体系的な機能解明のためには、多様な骨格を有する有機セレン化合物を簡便に供給可能な合成手法の確立が不可欠である。

以上の背景から本研究では、(i) ペプチド S-S 結合へのパーフルオロアリール基・アルシニル基の直接挿入反応、(ii) ペプチドポリスルフィドの交換反応による非対称化およびエステル化法、(iii) セレンリンカーを有するビス複素環誘導体のロジウム触媒合成法の開発を行った。

## 1. 無保護ペプチドジスルフィドへのロジウム触媒パーフルオロアリール基挿入反応

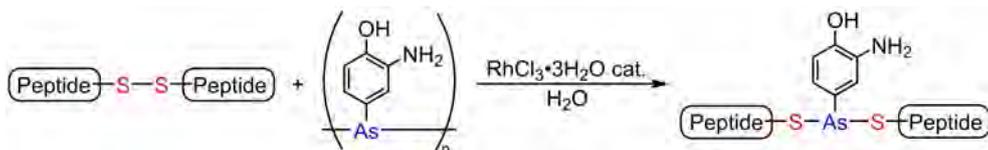
RhH(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> 触媒存在下、無保護ペプチドジスルフィドとパーフルオロアレーンを反応させると、S-S 結合間にパーフルオロアリール基を挿入できた。本反応はチオールの求核性を利用する従来法とは異なり、S-S 結合間に直接 1,4-位選択的にパーフルオロアリール基を挿入した初めての例である。



## 2. 無保護ペプチドジスルフィドへのロジウム触媒アリールアルシニル基挿入反応

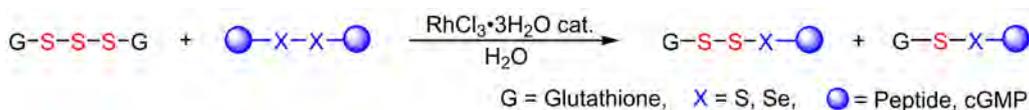
RhCl<sub>3</sub> · 3H<sub>2</sub>O 触媒存在下、無保護ペプチドジスルフィドと環状ポリアルシンの反応により、S-S

結合間にアリールアルシニル基を挿入する新規触媒反応を見出した。本反応はチオール基では進行せず、ジスルフィド結合に特異的な反応で、水中均一系で触媒的に進行する特徴がある。



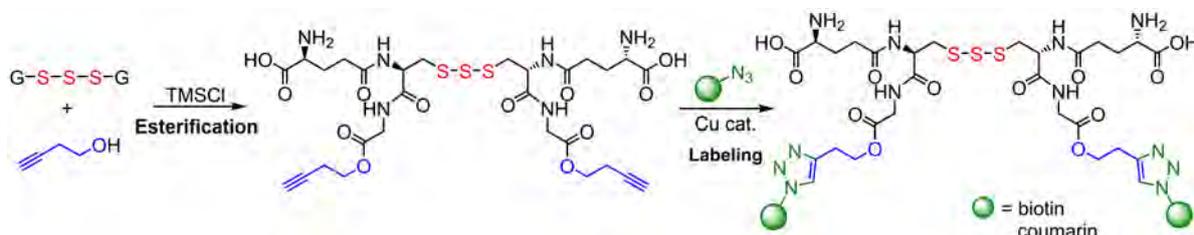
### 3. ロジウム触媒交換反応による非対称ペプチドトリカルコゲニドの合成

$\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  触媒存在下、無保護グルタチオントリスルフィド  $\text{GSSSG}$  とジスルフィド化合物を水中均一系で反応させると、 $\text{S-S-S}$  結合と  $\text{S-S}$  結合の交換反応により非対称ペプチドトリスルフィドを合成できた。また、ジスルフィドの代わりにジセレニドを用いると、 $\text{S-S-Se}$  結合を有する非対称ペプチドトリカルコゲニドを合成できた。本反応により、水中均一系でペプチドポリスルフィドへの  $\text{cGMP}$  などの機能性ユニット導入が簡便に可能となった。



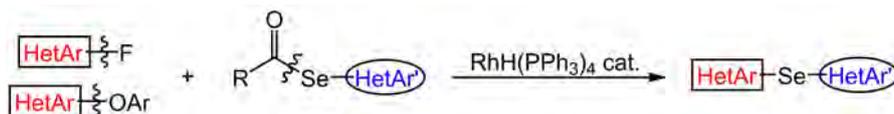
### 4. ペプチドポリスルフィドの化学的特性に基づくエステル化および標識化

グルタチオンポリスルフィドの大量合成法を確立し、化学的特性を調べた結果、 $80^\circ\text{C}$  以下および  $\text{pH} 9$  以下の条件で安定であることが分かった。この知見に基づき、塩化トリメチルシランを用いた酸性条件下において、イオウ原子の脱離を伴わないグルタチオンポリスルフィドのエステル化に成功した。さらに、導入したアルキン部位を利用して銅触媒環化付加反応によりビオチンおよびクマリン蛍光分子による標識化を達成した。



### 5. セレンリンカーを有する非対称ビス複素環誘導体のロジウム触媒合成

本研究では、イオウと同族の第 16 族第 4 周期元素であるセレンとの機能比較を目的として、新規な有機セレニド誘導体を合成した。生体親和性の高い分子骨格として、 $\text{RhH}(\text{PPh}_3)_4$  触媒存在下、複素環セレノエステルと複素環フッ化物または複素環エーテルを反応させて、非対称ビス複素環セレニドを高効率かつ簡便に合成した。セレノエステルを複素環セレノ化剤として利用することを特徴とし、多様な 5 員環および 6 員環複素環セレニドの合成を達成した。



本研究では、シスチンジスルフィドおよびトリスルフィド ( $\text{S-S-S}$ ) 結合の化学的性質を理解した上で、無保護ペプチドを対象とした挿入、交換、ならびに官能基変換反応を体系的に展開し、新規なペプチド誘導体の創製を実現した。さらに、これらの化学変換により、生物活性部位の導入や標識化を容易に行うことが可能となり、加えて合成したセレン誘導体との機能比較を通じて、得られた化合物群の生物学的有用性を明らかにした。

氏 名 : 中村 紗彩

論 文 名 : 大豆由来ペプチドの生理機能評価のための *in silico* 法の展開に関する研究

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

近年、世界的に非感染性疾患 (noncommunicable diseases: NCDs) の罹患者数が増加しており、その多くは生活習慣や食習慣に起因する予防可能な疾患である。NCDs は不可逆的な疾患であり、長年にわたり生活の質 (QOL) を損なうだけでなく、医療費の増大を招くことから、未病段階における予防的介入の重要性が一層高まっている。とりわけ、日常的に摂取可能で安全性の高い「食」を基盤とした予防的アプローチは、持続可能性と実践可能性の観点から極めて有望である。食品由来ペプチドは構成アミノ酸の配列多様性に基づいて多岐にわたる生体調節作用を示す点から注目されており、これまでに高血圧、糖尿病や肥満予防など幅広い生体調節作用が報告されている。なかでも大豆タンパク質は、栄養価に優れ、伝統的発酵食品から近年のプラントベース食品に至るまで幅広く利用されてきたタンパク源であり、その中には潜在的に多様な多様な生体調節ペプチド配列が含まれている。しかしながら、理論上数百~数千におよぶペプチド配列を従来の *in vitro*/*in vivo* 試験で網羅的に評価することは多大な時間・労力・コストの観点から現実的ではない。加えて近年、3Rs 原則に基づく動物実験削減の国際的潮流が加速しており、食品機能性研究においても倫理的かつ効率的な代替評価手法の確立が求められている。そこで本研究では、大豆タンパク質配列に含まれるペプチドを対象とし、生体調節機能を高精度かつ効率的に予測するための *in silico* 法の確立とその妥当性を明らかにした。

*in silico* および *in vitro* 解析から AdipoR1 アゴニストとして機能予測された大豆由来ペプチド YP について、生体レベルでの作用発現を検証した。非肥満 II 型糖尿病自然発症モデルである SDT ラット (雄性、16 週齢) に対して、YP (1 mg/kg/day) を 14 週間経口投与した結果、Control 群に認められた過食や体重減少といった典型的な糖尿病症状は出現せず、空腹時血糖値 (BGL) は投与期間を通して正常域 (80~99 mg/dL) に維持された (29 週齢時: Control 群,  $142 \pm 14$  mg/dL; YP 群,  $93 \pm 13$  mg/dL; PY 群,  $115 \pm 11$  mg/dL,  $p < 0.05$ )。また、糖尿病前症段階 (22 週齢) で実施した経口糖負荷試験では、YP 投与群においてのみ速やかな糖クリアランスが認められ、耐糖能異常が顕著に改善された ( $AUC_{0-120min}$ : Control 群,  $754 \pm 50$  mg·h/dL; PY 群,  $757 \pm 32$  mg·h/dL; YP 群,  $545 \pm 18$  mg·h/dL,  $p < 0.01$ )。他方、PY 群ではこれらの抗糖尿病作用は認められず、ペプチド配列の重要性が示された。さらに、投与終了時の骨格筋におけるタンパク質発現量解析により、YP 摂取群において AdipoR1 ならびに *p*-AMPK/AMPK 発現増大が認められ、*in silico* で予測されていた AdipoR1 アゴニスト作用が *in vivo* 試験で再現された。これらの知見は、*in silico* 予測が実際の生体作用と整合することを示す重要な知見である。

以上本研究により、大豆由来ペプチドが機能性食品素材として高い有用性を有することが改めて明示されるとともに、本 *in silico* 手法が食品由来ペプチドの機能性を効率的かつ高精度に予測する